

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 3 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19709

研究課題名(和文)細胞外環境依存的な毛包幹細胞の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Toward understanding regulatory mechanisms of stem cell homeostasis in hair follicle

研究代表者

森田 梨津子 (Morita, Ritsuko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：20700040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成体毛包幹細胞の多様性とその維持に寄与する細胞外環境の誘導機構を明らかにするため、分子マーカー非依存的な2つの手法：マウス毛包発生のex vivo 4次元ライブイメージング法と1細胞トランスクリプトームを統合させたマルチオミックス解析を行った。ライブイメージングにおいて、毛包の細胞動態を網羅的に追跡することで、毛包幹細胞の起源と細胞系譜を同定することに成功した。さらに、胎児期毛包組織から経時的に取得したsingle cell transcriptomeの解析から、幹細胞が分化・成熟していく過程の細胞状態の変遷を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、一見均質な細胞から幹細胞と分化細胞が生まれ組織の秩序や恒常性が形成されていく仕組みを理解することは、毛包だけでなく多くの器官発生に普遍的に存在する「可塑性と頑強性」の理解に繋がると期待される。さらに、幹細胞の適切な維持・制御に必須な細胞周辺環境の解明につながれば、生体外における毛包培養や胎仔性幹細胞の誘導・増殖・分化の制御技術の開発に大きく寄与することが期待され、将来的には薬剤評価系の確立など、皮膚や毛包に伴うがんや疾病に向けた創薬開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the induction mechanisms of mouse hair follicle stem cells and their surrounding microenvironment by combining two marker-independent single cell methods, namely the single-cell resolution 4D live imaging and single-cell transcriptome. We established an ex vivo live imaging system for developing hair follicles that can visualize the cell behaviour and lineages of every cell at single cell resolution. Retrospective tracking of the stem and differentiated cells in time-lapse image data revealed the originating region of the hair follicle stem cells and their developmental dynamics and lineages. Moreover, we obtained single-cell transcriptome data from embryonic hair follicle throughout development and transcriptome analysis revealed the changes of cellular status leading to the emergence of stem cell population during hair follicle development.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：live imaging single cell RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

私たちがモデルとする皮膚とその付属器官である毛包は、生涯にわたって再生を繰り返す器官であり、幹細胞研究の良いモデルである (*Trends Genet* 8(2):55-61, 1992)。これまでの毛包表皮幹細胞の研究は、主にマウス成体皮膚を対象に進められ、マーカー遺伝子の発現と毛包再生への寄与を基準に、複数種類の細胞から構成される多様な幹細胞集団の同定や制御因子の理解が進んだ。さらに我々や他のグループにより、毛包幹細胞の増殖と分化のバランスは、幹細胞周囲の微小環境 (幹細胞ニッチ) からのシグナルによって適切に制御されること、ニッチと幹細胞の関係は一方方向性ではなく、双方方向性に互いを制御し合っていることなどが示され (Fujiwara *et al.*, *Cell* 2011; Donati, Fujiwara *et al.*, *PNAS* 2014)、幹細胞がニッチとの相互作用の中で、当初考えられていたよりも柔軟でロバスタな幹細胞維持システムを構築している可能性が示唆されている。一方で、「発生過程」における組織幹細胞の「起源と誘導メカニズム」の理解は進んでおらず、例えば、一見均一な胎仔性の前駆細胞の集団から、どのようにして多様な毛包組織幹細胞が正しい場所に正しい時に誘導されるのか、ニッチと幹細胞の相互依存的な関係が胎仔期にどのように生み出されるのかについては、いまだ多くが謎に包まれている。

2. 研究の目的

幹細胞発生過程の解析が進まない一因に、初期幹細胞を標識しうるマーカー遺伝子がいまだ同定されていないことが挙げられる。そこで本研究では、分子マーカーに依存しない2つの手法：マウス毛包発生 *ex vivo* 4次元ライブイメージング法と1細胞トランスクリプトームを統合させたマルチオミックス解析から、多様な成体毛包幹細胞の起源とその誘導メカニズム、さらに維持機構の成立過程を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 発生過程における幹細胞前駆細胞の起源と細胞系譜、ダイナミクスの理解

毛包幹細胞とその周囲環境の発生過程を明らかにするために、多光子顕微鏡システム (Olympus) と細胞の核および細胞膜を蛍光標識した遺伝子改変動物 (R26-H2B-GFP, R26-Lyn-Venus, K14-H2B-EGFP) を用いて、マウス毛包発生 *ex vivo* 4次元ライブイメージング法を確立した。さらに、取得したライブイメージング上で、分子マーカーに頼らず、細胞の動きや分裂を追跡し、毛包幹細胞の起源と細胞系譜の同定を試みた。

(2) 幹細胞と周囲環境の時間的発展過程の理解

ライブイメージングから明らかにされた幹細胞の細胞系譜に加えて、細胞の分化状態の時間的な発展を詳細にプロファイリングしていくために、各発生ステージの毛包組織から分取した細胞の1細胞RNA-seqを実施した。この際、発生初期の幹細胞の前駆的な細胞を標識する分子マーカーが同定されていないことから、光変換型蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを用いて、各発生ステージの毛包組織を任意に標識し、細胞を単離した。最終的に、胎齢12.0日、13.0日、14.0日、15.0日、17.0日の毛包細胞の高品質な1細胞トランスクリプトームデータを取得した。

4. 研究成果

(1) 発生過程における幹細胞前駆細胞の起源と細胞系譜、ダイナミクスの理解

細胞の系譜は、細胞の分裂と三次元的な位置変化を基にした、経時的な細胞の追跡結果と最終的な細胞の分化方向をつなげることで理解できる。さらに、細胞系譜の時間を遡ることにより、幹細胞の起源がいつ、どこで生まれるのかを理解することができると考えられる。本研究では、マウス胎仔頬髭毛包の初期発生 *ex vivo* 4次元ライブイメージング技術を確立した。本イメージングシステムでは、単層の上皮組織から毛包プラコードが誘導され、さらに肥厚した毛包上皮組織が間葉組織に陥入して、毛包特有の形態を形成する過程、さらに幹細胞領域が形成されるとともに毛産生細胞が分化して毛を産生するまでの過程を含む、マウスの胎齢12日から17日に相当する毛包発生を1細胞レベルの解像度で連続的に捉えることができた。さらに我々は、比較的初期から発現する幹細胞マーカーを同定している。レポーターマウスを用いて、将来的に幹細胞となる細胞を可視化した上で、マーカー遺伝子の発現する前の時間に遡って細胞を追跡することで、幹細胞の発生過程における細胞系譜や動態、起源を同定した。

(2) 幹細胞と周囲環境の時間的発展過程の理解

次の課題として、毛包幹細胞の前駆細胞の細胞状態が他の細胞とどのように異なるのか、またどのような遺伝子発現の変化を経て組織幹細胞へと発展するのかを明らかにすることが挙げられる。本研究では、マウス毛包器官発生 *ex vivo* 4次元ライブイメージングにより同定された毛包幹細胞の前駆細胞とその周囲細胞集団の細胞状態の変遷を明らかにするため、毛包陥入が起こる胎

胎齢 12.0 日、幹細胞領域が発達する前後の胎齢 13.0 日、14.0 日、15.0 日、胎仔性幹細胞集団の区画化が完成する胎齢 17.0 日の 5 ステージについて、幹細胞前駆細胞と分化細胞を含む細胞集団を分取し、1 細胞 RNA-seq を実施した。このとき、幹細胞の発生初期の前駆的な細胞を標識する分子マーカーが存在しないため、KikumeGR などの光変換型蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物を用いて任意の領域を標識し、細胞を分取して 1 細胞 RNA-seq を実施する新手法を確立した。発生過程を通して経時的に取得した 1000 細胞を超える Transcriptome 解析では、ライブイメージングでの動態解析結果と一致して、プラコード期の細胞から、細胞運命が分岐してそれぞれの細胞系譜ごとに分化・成熟していく過程が明らかになった (Fig. 1)。さらに、これまでの既知マーカーでは分類されなかった新規の幹細胞集団が同定された。トランスクリプトーム解析は現在も進行中であるが、本研究において、幹細胞予定細胞の存在とその周囲環境の成熟過程を、これまでにはない精度で詳細にプロファイリングされることが期待される。

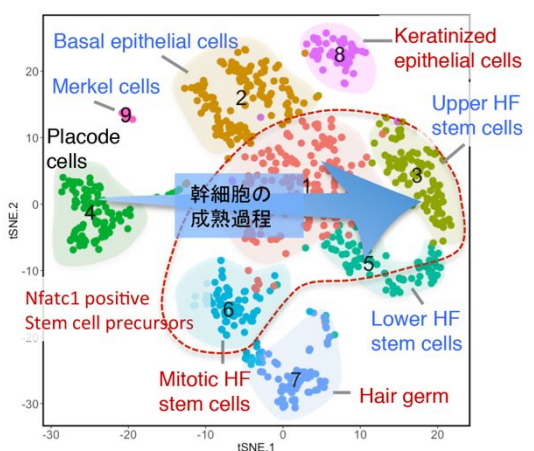


Fig. 1 毛包上皮細胞集団のプロファイリング 胎児期毛包上皮細胞の single-cell transcriptome データを次元圧縮し、クラスタリングを行った。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Hisako Takigawa-Imamura, Ritsuko Morita, Takafumi Iwaki, Takashi Tsuji and Kenichi Yoshikawa, Tooth germ invagination from cell-cell interaction: Working hypothesis on the mechanical instability, Journal of Theoretical Biology, 査読有, 382, 2015, 284-291
doi:10.1016/j.jtbi.2015.07.006
Ritsuko Morita, Miho Kihira, Yousuke

Nakatsu, Yohei Nomoto, Miho Ogawa, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Tetsuhiko Tachikawa, Yukitaka Ishimoto, Yoshihiro Morishita, Takashi Tsuji, Coordination of Cellular Dynamics Contributes to Tooth Epithelium Deformations, PLoS One, 査読有, 11(9), 2016, e0161336
doi: 10.1371/journal.pone.0161336

[学会発表] (計 4 件)

森田 梨津子, 毛包幹細胞の起源と誘導メカニズムの解明を目指して, 第5回皮膚の会, I & I LAND アイ・アイ・ランド, 大阪, 四条畷, 2017年3月4日, 口頭発表

Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara, Deciphering the molecular and cellular basis of the induction of hair follicle stem cells, RIKEN Joint Retreat 2017, Hamanako Royal Hotel, Shizuoka, Hamamatsu, 2017年2月2日, ポスター発表

Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara, Deciphering the molecular and cellular basis of the induction of hair follicle stem cells, The 27th CDB Meeting "Body surface tactics: cellular crosstalk for the generation of super-biointerfaces", RIKEN CDB, Hyogo, Kobe, 2016年11月14日, ポスター発表

森田 梨津子, 毛包幹細胞の起源と誘導メカニズムの解明を目指して, 第4回皮膚の会, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫, 淡路, 2016年3月5日, 口頭発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 梨津子(MORITA RITSUKO)
独立行政法人理化学研究所
・多細胞システム形成研究センター・研究員
研究者番号:20700040

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし